

Anticorpi anti transglutaminasi tissutale ricombinante umana: valutazione di un kit commerciale e studio comparativo con metodi che utilizzano antigene da cavia

Sandra Perticarari, Claudia Znidarcic, Livio Pikiz, Emanuela Fragonas, Serena Canova, Mario Prodan
Laboratorio Analisi. IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

ABSTRACT

Human recombinant Tissue-Transglutaminase antibodies: evaluation of a commercial kit and comparison of methods using guinea pig or human antigens

The tissue-Transglutaminase (t-Tg) has been reported to be the target for endomysial antibodies in coeliac disease. Coeliac disease if untreated, even if clinically silent, predispose for other autoimmune disease. ELISA methods to detect anti tissue-Transglutaminase provide efficient alternative to the anti-endomysial (EMA) immunofluorescent method and are suitable for screening. Our aim was to compare four commercial kit utilizing t-Tg from guinea pig (GP-tTG) to the standard method that we developed in our laboratory and with the new method employing human recombinant t-TG (hr-tTG). We tested serum samples from 16 untreated coeliac patients, 10 coeliac patients in gluten free diet, 22 subjects with other disease and 32 healthy controls. Results show that human t-TG had a superior efficiency in diagnosis of coeliac disease.

RIASSUNTO

L'autoantigene che lega gli anticorpi antiendomsio determinati con immunofluorescenza nella malattia celiaca è stato identificato nella transglutaminasi tissutale (tTG). La malattia celiaca se non trattata con la dieta priva di glutine, anche quando non si manifesta con sintomi clinici evidenti, predispone ad altre malattie autoimmuni. I metodi ELISA per la determinazione degli anticorpi antri t-TG forniscono una efficiente alternativa al metodo in immunofluorescenza per uno screening su larga scala. Il nostro obiettivo è di paragonare quattro kit commerciali che impiegano la tTG da cavia ed un metodo da noi sviluppato e routinariamente utilizzato, analogamente basato su antigene da cavia, a confronto con un nuovo metodo che impiega t-TG ricombinante umana (hr-tTG). Abbiamo esaminato i sieri di 16 pazienti con celiachia non trattata, 10 con celiachia in dieta priva di glutine, 22 pazienti con altre malattie e 32 soggetti sani. I risultati dimostrano la superiorità dell'esame con hr-tTG rispetto a quello con antigene da cavia nella diagnosi di celiachia

INTRODUZIONE

La malattia celiaca è una patologia su probabile base autoimmune, scatenata dall'ingestione di glutine nei soggetti geneticamente predisposti (1,2). E' caratterizzata da malassorbimento, diarrea, perdita di peso e totale atrofia dei villi del tratto digiuno-duodenale, tuttavia questi sintomi si presentano solo nel 30-40% degli individui sensibili al glutine, negli altri pazienti la malattia può manifestarsi con una varietà di sintomi che vanno da totale assenza di disturbi all'anemia grave (3).

La terapia consiste nella dieta priva di glutine per tutta la vita, raccomandata in particolare nei bambini per evitare malassorbimento e ritardo di crescita, ma anche nel caso di celiachia "latente" diagnosticata in età adulta a causa del rischio elevato di insorgenza di altre malattie autoimmuni e di tumori intestinali (4). I pazienti affetti da malattia celiaca non trattata presentano anticorpi circolanti anti gliadina, una frazione del glutine, sia di classe IgA che IgG. Per molti anni gli anticorpi anti gliadina hanno rappresentato l'esame di elezione per la diagnosi di celiachia; poiché

quelli di classe IgA si mostravano più specifici (87%) mentre quelli di classe IgG più sensibili (90%) era consigliabile eseguire entrambi gli esami per accrescerne l'affidabilità (5,6). Gli anticorpi anti endomysio tuttavia si sono dimostrati l'esame più specifico e con il migliore valore predittivo, con le limitazioni dovute alla metodica di immunofluorescenza su sezione di esofago di scimmia o di vena ombelicale umana. (7,8)

Nel 1997 Dieterich ed altri (9,10) hanno dimostrato che l'autoantigene riconosciuto dagli anticorpi anti endomysio si identifica con la transglutaminasi tissutale (tTG). L'antigene purificato da fegato di (GP-tTG) può essere utilizzato cavia nelle tecniche ELISA, con tutti i vantaggi derivanti dal poter disporre di una metodica automatizzabile, applicabile su larga scala per lo screening, e non soggettiva come l'immunofluorescenza. L'esperienza dei numerosi lavori di questi ultimi 4 anni ha tuttavia portato alla conclusione che la determinazione degli anticorpi anti tTG non fornisce le stesse informazioni della determinazione degli EMA, che rimane l'esame di conferma per la diagnosi di celiachia (11,12,13). La GP-tTG presenta alcuni problemi

di stabilità, richiede accorgimenti come la presenza di ioni Ca^{++} per essere attivata e riconosciuta dagli anticorpi. La sua specificità è inoltre molto legata al grado di purezza del lotto utilizzato. Tutti questi inconvenienti potrebbero essere superati dall'uso di tTG ricombinante umana. Lo scopo del nostro lavoro è stato di verificare se la hr-tTG offre risultati migliori rispetto a quelli ottenibili con antigene estrattivo da cavia. Abbiamo confrontato i risultati ottenuti con il metodo da noi sviluppato e con alcuni kit commerciali che utilizzano l'antigene da cavia con il metodo recentemente proposto dalla Eurospital che utilizza tTG ricombinante umana.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 80 sieri conservati a $-20^{\circ}C$ nella seroteca del laboratorio di analisi da non più di tre mesi, inviati al laboratorio dalla Clinica Pediatrica, dalla sezione di gastroenterologia o come pazienti esterni, per sospetto clinico di celiachia, o per altre patologie, di età compresa tra 1 e 14 anni. Dall'archivio di data-base sono stati poi raggruppati come affetti da celiachia quelli che avevano ricevuto effettivamente la diagnosi sulla base della biopsia intestinale, 26 soggetti, di cui 16 non in trattamento e 10 in dieta priva di glutine. 32 sieri sono di soggetti pediatrici che hanno eseguito un prelievo per controlli pre-operatori per piccoli interventi chirurgici, stomatologici, ortopedici, e sono stati considerati come gruppo di controlli sani. Dei 22 pazienti con sospetta celiachia non confermata da biopsia, 2 erano affetti da morbo di Crohn, 10 erano affetti da disturbi di varia natura: dolori addominali, diarrea, ritardo di crescita, questi sono stati considerati controlli patologici. Su tutti i sieri sono stati ricercati gli EMA con immunofluorescenza indiretta su sezioni criostatiche di vena ombelicale umana con la metodica già descritta (8).

In tutti i sieri sono anche stati misurati per gli anticorpi anti GP-tTG di classe IgA e IgG con il metodo immunoenzimatico sviluppato nel nostro laboratorio, utilizzato routinariamente da diversi anni. Il metodo è stato validato su una casistica costituita da 106 pazienti celiaci con diagnosi accertata mediante biopsia, 24 controlli gastroenterologici (Morbo di Chron, malattia infiammatoria dell'intestino, intestino corto) e 120 controlli sani, tutti di età compresa fra 1 e 32 anni. Il metodo prevede l'adesione a piastre per immunoenzimatica (Costar high binding), dell'antigene GP-tTG (Sigma Aldrich) proveniente da tre diversi lotti mescolati e aliquotati, alla concentrazione di $1 \mu g/ml$ in PBS con Ca^{++} e Mg^{++} (Seromed), segue una incubazione a temperatura ambiente per una notte in camera umida. Le piastre sono quindi lavate tre volte con PBS tween 0.05%, la saturazione dei siti aspecifici viene fatta mediante l'aggiunta di $300 \mu l$ per pozzetto di PBS-BSA 1% per un ora a $37^{\circ}C$. Le piastre sono quindi immediatamente utilizzate. Vengono depositi $100 \mu l$ di siero in esame diluito 1:50 in PBS-BSA 1% per pozzetto, in duplicato. Come calibratore si utilizza un pool di sieri positivi precedentemente testati, come sieri di controllo un siero fortemente positivo ed uno negativo precedentemente testati. Segue un'incu-

bazione di 1 h a 37° . Dopo tre lavaggi con lavatore automatico per piastre, vengono aggiunti $100 \mu l$ di anticorpo anti IgA o anti IgG coniugato con fosfatasi (Jackson) diluito 1:3500 in PBS-BSA 1% con PEG 4%. Viene eseguita un'ulteriore incubazione di 1 h a $37^{\circ}C$. Dopo altri tre lavaggi vengono aggiunti $100 \mu l$ di cromogeno preparato con 1 pastiglia PNPP (1mg) ogni 5 ml di tampone glicina o dietanolamina a pH 9.4 contenente ioni Mg^{++} . La lettura viene eseguita con uno spettrofotometro EL312e Microtiter (Bio-Teck, Packard Instruments) a 405 nm, i dati espressi in Unità Arbitrarie (UA) calcolati come rapporto tra la DO del campione e la DO del calibratore per 100. Il cut-off al di sopra del quale la misura è considerata positiva è stato calcolato come media più 2 deviazioni standard dei valori ottenuti da 125 sieri di soggetti sani.

Sono stati utilizzati i seguenti kit commerciali anti tTG, tutti basati su metodica immunoenzimatica, ed eseguiti secondo le indicazioni della ditta fornitrice:

1. CeliAK Ema-Transglutaminase. Medipan, Germania, distribuito dalla Alifax, Padova Italia
2. Endomysium IgA Elisa kit. D-tek Blue WELL, Belgium, distribuito dalla Sorin, Vercelli It.
3. Eu-tTG IgA Eurospital. Trieste, Italia.
4. Questi kit utilizzano come fase solida l'antigene t-Tg da cavia.
5. Eu-tTG human IgA. Eurospital. Trieste, Italia.

L'antigene adsorbito alla piastra è tTG ricombinante umana.

RISULTATI

I dati relativi al metodo da noi sviluppato sono rappresentati nella Figura 1. Su 106 pazienti celiaci, otto sono risultati negativi per gli anticorpi di classe IgA. Due di questi erano anche EMA negativi ma positivi per anti tTG IgG, e si sono poi rivelati pazienti con deficit di IgA. Nell'ambito dei 120 controlli sani solo due sono risultati falsamente positivi per le IgA e nove per le IgG. Il cut-off calcolato per le IgA è di 7.64 UA e per le IgG di 21.1 UA. La sensibilità e la specificità delle IgA risultano rispettivamente del 92% e 98% mentre per le IgG del 97% e 92.5%.

Nella tabella 1 sono riassunti i risultati ottenuti con i diversi kit, indicando i positivi per ciascun gruppo di pazienti studiati. Gli ottanta sieri su cui è stato eseguita la misura delle IgA anti t-TG con i kit commerciali sono stati analizzati per le IgA anche con il metodo sviluppato nel nostro laboratorio. Ovviamente trattandosi di una casistica piccola rispetto a quella più numerosa precedentemente studiata, la sensibilità e specificità del nostro metodo sono risultate diverse (vedi tabella 2). Limitando il confronto alla casistica degli ottanta sieri studiati la specificità e il valore predittivo positivo del nostro metodo e dei kit commerciali che utilizzano GP-tTG, sono risultati inferiori al kit che utilizza hr-tTG e agli EMA.

I pazienti con celiachia non trattata ed alti titoli di anticorpi antiendomiosio, si sono confermati quasi tutti positivi in base ai cut-off indicati nei diversi kit, con una sensibilità vicina al 100% (vedi tabella 2). Alcuni dei pa-

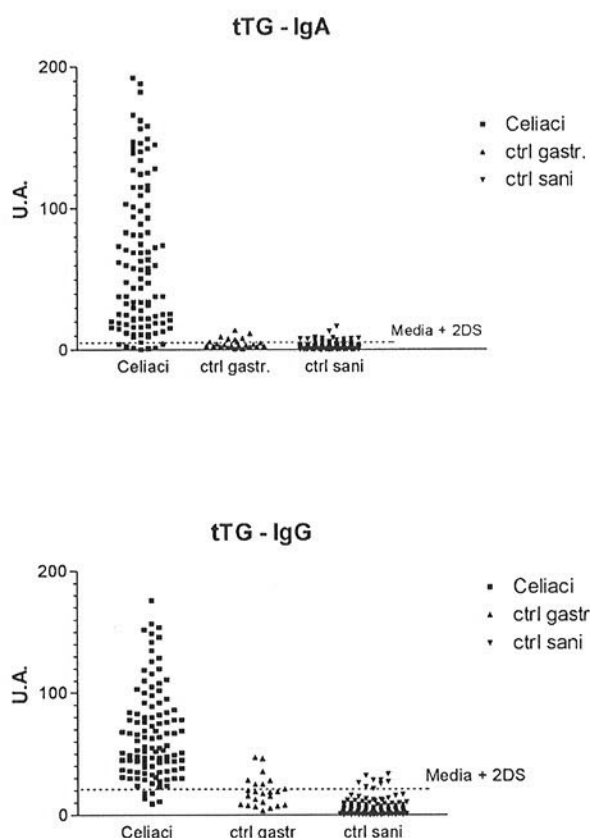


Figura 1
 Anticorpi anti tTG da cavia, IgA e IgG, in pazienti celiaci, pazienti con altre malattie gastrointestinali, e controlli sani. La linea orizzontale rappresenta il cut-off calcolato come media più 2 deviazioni standard dei valori ottenuti dal gruppo di controlli sani

zienti celiaci in dieta priva di glutine hanno dato valori borderline con tutti i metodi, mentre risultavano tutti EMA negativi, questi dati non sono stati utilizzati per calcolare la sensibilità e la specificità in quanto non è noto se tutti i pazienti aderissero strettamente alla dieta. Nell'ambito dei controlli patologici alcuni sierii, da 1 a 4, sono risultati positivi con quasi tutti i metodi che utilizzano l'antigene da cavia, il paziente affetto da morbo di Crohn in particolare

Tabella 1
 Dati riassuntivi dei serie positivi per ciascun gruppo di pazienti studiati

Antigene	Ditta produttrice	Sieri positivi/sieri esaminati			
		Celiaci non trattati	Celiaci in dieta senza glutine	Controlli patologici	Controlli sani
GP-tTG	Eurospital	16/16	3/10	2/22	0/32
GP-tTG	Medipan	16/16	5/10	4/22	4/32
GP-tTG	D-Tek	15/16	3/10	3/22	2/32
hr-tTG	Eurospital	16/16	2/10	1/22	0/32
GP-tTG	Metodo nostro	15/16	2/10	2/22	0/32
EMA (Vena ombelicale)	-----	16/16	1/10	0/22	0/32

è risultato positivo con tutti i kit commerciali, compresa la nostra metodica, e con il kit di hr-tTG, benché EMA negativo.

Per quanto riguarda il gruppo di controlli sani tutti sono risultati EMA negativi, mentre alcuni sono risultati positivi con vario grado di positività con i diversi kit. Nella tabella 2 sono esposti i dati calcolati di sensibilità, specificità, e valore predittivo di ciascun kit valutato.

DISCUSSIONE

La sensibilità e specificità della determinazione degli anticorpi anti t-TG da cavia per il metodo da noi messo a punto, nella casistica precedentemente studiata, più numerosa di quella usata per il confronto con gli altri 4 metodi, ricalca i risultati riportati in letteratura (10). Nell'ottimizzazione del nostro metodo anti tTG si è preferito favorire la specificità a scapito della sensibilità, in quanto si eseguiva sempre in parallelo anche la determinazione degli anticorpi di classe IgG e degli EMA. Questa scelta è stata possibile grazie al costo contenuto dei metodi sviluppati con reagenti di base senza acquistare i kit commerciali pronti per l'uso. I dati relativi alla determinazione di anti tTG IgA sugli 80 sierii pediatrici esaminati in confronto ai kit commerciali, conferma una buona specificità per il nostro metodo, con una sensibilità leggermente più bassa rispetto agli altri.

In base alla nostra esperienza nell'uso routinario, la t-TG da cavia non è esattamente sovrapponibile all'endomisio, sia quello da esofago di scimmia che quello da cordone ombelicale. Alcuni accorgimenti tecnici, come l'aggiunta di calcio nel tampone di "coating" per l'adesione dell'antigene alle piastre, o la mescolanza di lotti diversi (ad esempio l'uso di tre lotti diversi pre-testati e miscelati), possono migliorare la riproducibilità dell'esame ma non influiscono sull'attacco aspecifico all'antigene, questo problema è stato ovviato da alcuni autori eliminando il passaggio di saturazione con BSA in quanto molti soggetti, specialmente i bambini con aumentata permeabilità intestinale, possono presentare anticorpi anti BSA (12). D'altra parte il metodo immunoenzimatico rispetto all'immuno fluorescenza presenta indubbi vantaggi, non è soggettivo, è automatizzabile, si possono esprimere i dati in modo quantitativo e standardizzabile. Inoltre è possibile determi-

Tabella 2
Sensibilità, specificità e valore predittivo dei metodi confrontati

Antigene	Ditta	Sensibilità	Specificità	Valore predittivo positivo
GP-tTG	Eurospital	100%	96,2%	88,8%
GP-tTG	Medipan	100%	85,1%	66,6%
GP-tTG	D-Tek	93,7%	90,7%	75%
GP-tTG	Metodo nostro (su 80 casi)	93%	96%	88,8%
GP-tTG	Metodo nostro (su 226 casi)	92%	98%	98%
Hr-tTG	Eurospital	100%	98%	94%
EMA (vena ombelicale)	-----	100%	100%	100%

nare anche gli anticorpi anti tTG di classe IgG, meno specifici ma utili nel caso di deficit di IgA (14). Questo dato è stato da noi confermato nei due soggetti EMA e tTG-IgA negativi sui quali gli anticorpi anti tTG-IgG sono risultati fortemente positivi, e per i quali è stato diagnosticato un deficit di IgA. Abbiamo rilevato falsi positivi antiGP-tTG sia con i Kit commerciali che con il nostro metodo, ma nessuno con la tTG umana. Nell'ambito dei controlli sani un soggetto positivo per la GP-tTG e negativo per la hr-tTG all'anamnesi e risultato intollerante alle proteine del latte vaccino. Il maggior numero di falsi positivi è stato riscontrato fra i controlli patologici con il kit Medipan che utilizza GP-tTG, e solo uno con il kit Eurospital che utilizza hr-tTG. La bassa specificità di alcuni kit commerciali sembra essere dovuta all'uso dell'antigene da cavia, probabilmente per problemi legati alla purezza dell'antigene, oppure alla cross reattività con altri autoanticorpi; questi problemi sembrano superati dall'uso di tTG ricombinante umana. I nostri dati concordanti con quelli riportati da altri autori (15) sembrano supportare la migliore efficienza della hr-tTG rispetto alla GP-tTG. Questi dati devono essere confermati su una casistica più ampia.

BIBLIOGRAFIA

- Maki M. Autoantibodies as a Marker of Autoimmunity in Coeliac Disease Pathogenesis. In *Gastrointestinal Immunology and Gluten-Sensitive Disease*. Proceedings of the Sixth International Symposium on Coeliac Disease held at Trinity College, Dublin Feighery C, O'Farrelly C Eds. 1992
- Sollid ML and Thorsby E. HLA Susceptibility genes in Coeliac Disease: Genetic Mapping and Role in Pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;105:910-922.
- Sollid ML, Scott H. New tool to predict coeliac disease on its way to the clinics. *Gastroenterology* 1998;115: 1584-1594.
- Troncone R, Greco L, Mayer M, Paparo F, Caputo N, Micillo M, Mugione P, Auricchio S. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr-Suppl.* 1996 May; 412:10-4
- Volta U, Lenzi M, Cassani F, Lazzari R, Bianchi FB, Pisi E. Gliadin antibodies in coeliac disease. *Lancet* 1983;1:1285.
- Perticarari S., Not T., Cauci S., Luchesi A., Presani G. ELISA method for quantitative measurement of IgA and IgG specific anti-gliadin antibodies. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1992 Oct; 15(3): 302-9
- Burgin-Wolf A, Gaze H, Hadzinselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nussle D et al. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Chil* 1991; 66:941-7
- Not T, Città A., Lucchesi A, Torre G, Martellosi S, Ventura A. Anti-endomysium antibody on human umbilical cord vein tissue: an inexpensive and sensitive diagnostic tool for the screening of coeliac disease. *Eur. J. Pediatr.* 1997;156, 616-8.
- Dieterich W, Enhis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue Transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nat Med* 1997; 3:797-801
- Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillet H, Riechen EO, Schuppan D. Autoantibodies to tissue Transglutaminase as predictor of coeliac disease. *Gastroenterology* 1998 115; 1317-1321
- Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabo IR, Sarnesto A, Savilhati E, Collin P, Maki M. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting coeliac disease. *Gastroenterology*. 1998; 115,1322-1328.
- Lock RJ, Pitcher MCL, Unsworth DJ. IgA anti-tissue transglutaminase as a diagnostic marker of gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol.* 1999 ;52:274-277
- Amin M, Eckhardt T, Kapitza S, Fleckenstein B, Jung G, Seissler J, et al. Correlation between tissue transglutaminase antibodies and endomysium antibodies as a diagnostic markers of coeliac disease. *Clin Chim Acta* 1999; 282(1-2): 219-25
- Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR. IgG(1) anti endomysium and IgG anti tissue transglutaminase(tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. Working Groups on coeliac disease of SIGEP and CLUB del Tenue GUT 2000; 47: 366-9
- Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A, Klareskog L. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 2000;30(4):379-8